

ミブヨモギの Santonin 生成に及ぼす Mn の影響（Ⅱ）

織 田 静 江

The effects of manganese ion on the formation of santonin
in *Artemisia monogyna* II

SHIZUE ODA

I 緒 言

著者は前報¹⁾において、ミブヨモギ中の Santonin の生成に Mn 施肥が有効であることを報告した。しかしこのような実験は試料の個体差が大きく、栽培時の環境による影響も考えねばならないので1年度の実験結果だけでは不十分と思われる。そのために栽培年度の異なるミブヨモギにつき試料の数を増して同じような実験を行い、Mn施肥試料と対照試料の Santonin 含有率から統計的に Mn施肥の効果を検討した。前回の実験では試料の成長量、Santonin、灰分、Mn、Fe について組織別に季節的变化を追究したが、今回は適当な時期に全試料を一度に採取して実験に供し、施肥したMnも前回の1/2量とした。また近頃解明された Isoprenoid の生合成過程から予想される Santonin の生成経路について Mn の有効性を考察した。

II 実験方法

試料は日本新薬株式会社山科農場で1955年に栽培したミブヨモギ山科2号種で、畑栽培の苗を24cmの鉢に移植し、その際各鉢に20g ずつの $MnCO_3$ を与えた試料と特に Mn 塩を加えない畑土のままの対照試料とをそれぞれ10鉢ずつ用意した。植付は5月25日に行い、7月12日に全試料を同時に採取した。採取試料は地上部と根を切離し、地上部の長さを測定したのち蔭干しにする。この風乾物を花蕾、葉、茎に分け各部の重量測定後、花蕾と葉についてそれぞれ水分、灰分、Mn、Santonin の定量を行なった。水分と灰分²⁾の測定は常法により、Mn も前報¹⁾と同様に処理し、Santonin は著者らの方法³⁾を用いて各株につき3回ずつ定量した。

III 実験結果および考察

1) 成長量

地上部の草丈と各組織の風乾重量は Table 1 と Table

2のとおりで、葉以外はすべて Mn 施肥試料の方が対照試料より僅かに良好であるが大差はない。この試料を前報¹⁾の試料と比較すると、草丈が長く重量は軽くて徒長気味になつており、根に比べて地上部はやや劣り、花蕾は前回試料を幾分上まわっているが茎葉は貧弱で、栽培年度による相違がみられた。

2) Santonin、灰分、Mnの含量

地上部から Santonin 含量の低い茎を除いた部分（花蕾と葉の合計）、花蕾および葉の Santonin 含有率は Table 3に、各株に含有されている Santonin の実重量は Table 4に示した。Santonin 含有率を同じ時期の前回試料と比べると大体同程度であるが、地上部（茎を除く、以下同じ）は前回より良くなつていた。Santonin 実重量では、1) 成長量に述べたように今回の試料の葉が貧弱であることが原因して、葉の含有量が悪くその影響が地上部のそれにもあらわれているが、花蕾の含有量だけは特に高かつた。次に Mn 施肥試料と対照試料を比較すると、含有率、含有量ともすべて Mn 施肥試料の方が対照試料よ

Table 1 地上部の草丈と風乾重量
(長さは cm, 重量は g)

No.	草 丈		重 量	
	Mn 施肥	対 照	Mn 施肥	対 照
1	67	67	12.0	12.0
2	63	67	13.5	12.5
3	63	65	12.0	11.0
4	68	63	17.0	13.0
5	60	61	13.5	16.5
6	61	67	15.5	13.0
7	71	60	14.5	11.5
8	60	61	12.0	15.0
9	62	58	12.0	14.5
10	67	62	15.0	13.0
平 均	64	63	13.7	13.2

Table 2 各組織の風乾重量 (g)

No.	花 蕾		葉		茎	
	Mn 施肥	対照	Mn 施肥	対照	Mn 施肥	対照
1	1.7	1.7	1.8	2.7	8.5	7.6
2	1.0	1.3	3.6	3.4	8.9	7.8
3	1.5	1.4	2.8	2.3	7.7	7.3
4	3.0	1.7	3.0	3.0	11.0	8.3
5	1.9	2.7	3.1	4.0	8.5	9.8
6	2.3	2.0	3.1	3.0	10.1	8.0
7	2.5	0.8	3.0	3.2	9.0	7.5
8	1.9	2.4	2.6	3.6	7.5	9.0
9	1.2	2.3	3.2	2.8	7.6	9.4
10	1.4	0.9	4.2	4.4	9.4	7.7
平均	1.8	1.7	3.0	3.2	8.8	8.2

Table 3 Santonin 含有率 (乾燥試料に対する%)

No.	地 上 部 (茎を除く)		花 蕾		葉	
	Mn 施肥	対照	Mn 施肥	対照	Mn 施肥	対照
1	0.96	0.82	1.52	1.55	0.41	0.37
2	0.70	0.59	1.32	1.15	0.52	0.37
3	0.72	0.76	1.30	1.36	0.40	0.39
4	0.97	0.58	1.55	0.98	0.39	0.35
5	0.67	0.71	1.34	1.45	0.25	0.21
6	1.18	0.77	2.08	1.37	0.46	0.37
7	1.08	0.56	1.88	1.39	0.40	0.35
8	0.83	0.53	1.35	0.92	0.43	0.26
9	0.78	0.90	1.39	1.61	0.54	0.33
10	0.78	0.49	1.59	1.06	0.52	0.37
平均	0.87	0.67	1.53	1.28	0.43	0.34
Mn施肥 対照	× 100		130		120	
					127	

り20~30%高くなっていた。葉ではこの増加の割合は前回よりかなり低下しているが、花蕾での増加率は高く前報試料の全期間を通じて最高の値を示した。また花蕾と葉の Santonin 含有率の比をとると、Mn 施肥試料で3.7、対照試料で4.0となった。

乾燥試料に対する灰分含有率の平均値は、Mn 施肥試料で花蕾9.24%、葉12.33%、対照試料では花蕾9.50%、葉12.47%となり、本試料の灰分含量は前回試料より低いことがわかった。

乾燥試料中のMn含有率の平均値は、Mn施肥試料で地上部0.145%、花蕾0.103%、葉0.172%、対照試料では地上部0.063%、花蕾0.049%、葉0.070%で前回試料より含有率が高く、特に花蕾においてはMn施肥、対照の両試料

Table 4 Santonin 含有量 (mg)

No.	地 上 部 (茎を除く)		花 蕾		葉	
	Mn 施肥	対照	Mn 施肥	対照	Mn 施肥	対照
1	29.70	31.52	23.31	22.78	6.39	8.74
2	27.87	24.36	11.83	13.33	16.04	11.03
3	27.20	24.76	17.45	16.90	9.75	7.86
4	51.67	24.05	41.47	14.84	10.20	9.21
5	29.24	41.96	22.52	34.59	6.72	7.37
6	55.84	34.25	43.65	24.53	12.19	9.72
7	52.41	19.96	41.97	9.96	10.44	10.00
8	32.46	27.87	22.90	19.75	9.56	8.12
9	29.86	41.33	14.89	33.02	14.97	8.31
10	38.28	23.06	19.00	8.88	19.28	14.18
平均	37.45	29.31	25.90	19.86	11.55	9.45
Mn施肥 対照	× 100		128		130	
					122	

とも目立って高い含有率を示した。対照試料に対するMn施肥試料の含量増加の割合は、地上部2.3倍、花蕾2.1倍、葉2.5倍で前実験と同じような結果となった。1株中に含まれるMnの実重量および灰分中の Mn_2O_3 の割合も全く同じ傾向を示し、いずれも対照試料の2.2倍から2.5倍に増加しており、与えた Mn^{++} を十分に吸収していることを実証した。

3) 統計処理によるMn施肥効果の検定

Santonin の組織別含有率において各株に3回ずつの測定値につき統計処理を行い、分析結果の信頼性とSantonin含有率の分散の度合を検討し、Mn施肥の影響の有意性をしらべた。まず対照試料の花蕾と葉、Mn施肥試料の花蕾と葉の4区分それぞれについてBartlettの方法により分散系列の均斉性の検定を行なった結果、

$$\text{花蕾の Santonin 含有率} \begin{cases} \text{対 照 試 料} & \chi_1^2 = 8.38 \\ \text{Mn 施肥試料} & \chi_1^2 = 5.38 \end{cases}$$

$$\text{葉の Santonin 含有率} \begin{cases} \text{対 照 試 料} & \chi_2^2 = 8.65 \\ \text{Mn 施肥試料} & \chi_2^2 = 13.23 \end{cases}$$

従つて信頼区間は χ^2 分布表⁴⁾から

$$\Pr\{\chi_1^2 > 8.26\} = 0.990 \quad (\text{D.F.} = 20)$$

$$\Pr\{\chi_1^2 < 9.59\} = 0.975$$

$$\Pr\{\chi_1^2 > \chi^2\} > 0.995 \quad (\text{D.F.} = 20)$$

$$\Pr\{\chi_1^2 < 7.43\} = 0.995$$

$$\Pr\{\chi_2^2 > 8.26\} = 0.990 \quad (\text{D.F.} = 20)$$

$$\Pr\{\chi_2^2 < 9.59\} = 0.975$$

$$\Pr\{\chi_2^2 > 12.44\} = 0.900 \quad (\text{D.F.} = 20)$$

$$\Pr\{\chi_2^2 > 15.45\} = 0.750$$

いずれの場合にも χ_0^2 は有意水準に達しなかつたので、各試料におけるSantonin含有率の分散は均斉であるとい

うことができる。

均斉性の検定の次に各試料について行なつた分散分析の結果を Table 5 にあげる。この表からまず第 1 に cell 内分散を class A と class B との間で比較すると

$$\text{花蕾では } F_{01} = \frac{f_1}{g_1} = 1.31 \quad \text{葉では } F_{02} = \frac{g_2}{f_2} = 1.15$$

F 分布表から

$$F_{(20, 20, 0.25)} = 1.36 \quad F_{(20, 20, 0.50)} = 1.00$$

$$\therefore F_{(20, 20, 0.50)} < F_{01} < F_{(20, 20, 0.25)}$$

$$F_{(20, 20, 0.50)} < F_{02} < F_{(20, 20, 0.25)}$$

これより各株についての 3 回の測定値の分散は対照試料と Mn 施肥試料との間に差がないといえる。第 2 に class A と B との cell 間分散を比べると

$$\text{花蕾では } F_{11} = \frac{e_1}{d_1} = 1.18 \quad \text{葉では } F_{12} = \frac{e_2}{d_2} = 2.36$$

$$F_{(9, 9, 0.10)} = 2.44 \quad F_{(9, 9, 0.25)} = 1.59$$

$$F_{(9, 9, 0.50)} = 1.00$$

$$\therefore F_{(9, 9, 0.50)} < F_{11} < F_{(9, 9, 0.25)}$$

$$F_{(9, 9, 0.25)} < F_{12} < F_{(9, 9, 0.10)}$$

となつた。故に各株間の Santonin 含有率の分散は対照と Mn 施肥の両試料の間に有意差がなく、各株間の分散については MnCO_3 の影響はあらわれていないとみてよい。第 1, 第 2 より cell 内の分散も cell 間の分散も対照と Mn 施肥試料の間に有意の差のないことがわかつたので、第 3 には両 class を通じて cell 内と cell 間の分散を比較したところ

$$\text{花蕾では } F_{21} = \frac{b_1}{c_1} = 21.21 \quad \text{葉では } F_{22} = \frac{b_2}{c_2} = 6.57$$

$$F_{(18, 40, 0.005)} = 2.67$$

$$\therefore F_{21} > F_{(18, 40, 0.005)}$$

$$F_{22} > F_{(18, 40, 0.005)}$$

となり、株間の分散は同一株について反覆した測定値の分散よりあきらかに大きいことを示している。そこで第

4 として cell 間の分散と class 間の分散を比較した。

$$\text{花蕾では } F_{31} = \frac{a_1}{b_1} = 4.86 \quad \text{葉では } F_{32} = \frac{a_2}{b_2} = 8.36$$

$$F_{(1, 18, 0.05)} = 4.41 \quad F_{(1, 18, 0.01)} = 8.29$$

$$\therefore F_{31} > F_{(1, 18, 0.05)}$$

$$F_{32} > F_{(1, 18, 0.01)}$$

すなわち、対照と Mn 施肥の両試料間の分散は株間の分散よりも大きく、 Mn^{++} を与えた影響が有意にあらわれていることが認められる。ただし、花蕾では危険率 5%，葉では危険率 1% である。

最後に t 分布表より $t_{(18, 0.05)} = 2.101$

なる数値を用いて両試料間の差の 95% 信頼区間を計算すると、

花蕾では $0.2484 \pm 0.2367\%$ (標準偏差 ± 0.1127)

葉では $0.0939 \pm 0.0682\%$ (標準偏差 ± 0.0325)

以上のような統計処理の結果から、Mn 施肥試料と対照試料の Santonin 含有率には有意の差があり、花蕾、葉ともに Mn 施肥により Santonin 含有率の増加することが統計的に確認されたわけである。

4) Santonin 生成機構の考察

1956年に乳酸菌の生育に酢酸代替因子として Mevalonic acid (MVA)⁵⁾⁻¹¹⁾が発見され、これが C_2 化合物から Terpene, Sterol¹²⁾¹³⁾や Carotenoid が生成される際の間体であることがわかり、1957年以来 MVA に関する数多くの研究が行われて Isoprenoid 生合成機構の解明は急速に進展した。主として微生物または動物組織を用いた研究で証明された生成過程は次のようなものであつた。

すなわち酢酸とアセト酢酸と Coenzyme A から Lynen らの提唱した HMGCoA cycle で¹⁴⁾⁻¹⁸⁾、または Leucine からの別過程で¹⁹⁾生じた β -Hydroxy- β -methyl glutaryl coenzyme A (HMGCoA) から MVA が生成され²⁰⁾、このものが磷酸化された 5-Phospho mevalonic acid (P-M

Table 5 分散分析表

	花蕾の Santonin 含有率			葉の Santonin 含有率		
	S. S.	D. F.	M. S.	S. S.	D. F.	M. S.
class 間	0.9253	1	0.9253 (a_1)	0.13228	1	0.13228 (a_2)
cell 間	3.4278	18	0.19043 (b_1)	0.28491	18	0.01583 (b_2)
{ class A の cell 間	1.5713	9	0.17459 (d_1)	0.08488	9	0.00943 (d_2)
{ class B の cell 間	1.8565	9	0.20628 (e_1)	0.20003	9	0.02223 (e_2)
cell 内	0.3590	40	0.00898 (c_1)	0.09630	40	0.00241 (c_2)
{ class A の cell 内	0.2038	20	0.01019 (f_1)	0.04480	20	0.00224 (f_2)
{ class B の cell 内	0.1552	20	0.00776 (g_1)	0.05151	20	0.00258 (g_2)
計	4.7121	59	0.07987	0.51350	59	0.00870

class A : 対照試料, class B : Mn 施肥試料, cell : No.1~No.10の各株, S.S. : 二乗和, D.F. : 自由度, M.S. : 不偏分散

VA)²¹⁾²²⁾, Mevalonic acid-5-pyrophosphate (MVA-PP) を経て更に MVA が脱炭酸され¹³⁾, Isopentenyl-1-pyrophosphate (IP-PP) となり²³⁾, これが縮合した後は Isomerase によつて γ - γ -Dimethylallylpyrophosphate²⁴⁾ となり, これらの結合によつて種々の Isoprenoid が生成する。

一方 Mn^{++} については, MVA 生合成の中間体である HMGCoA が Mn^{++} または Mg^{++} , Glutathione などの存在で動物組織により Acetyl-CoA とアセト酢酸に開裂すること²⁵⁾²⁶⁾, MVA から MVA kinase により P-MVA を生じ, これが P-MVAKinase の作用で MVA-PP となり, 更に脱炭酸酵素により IP-PP を生成する過程にいずれも ATP と共に Mn^{++} が要求されること²²⁾²³⁾, MVA から Squalene を合成する酵母磨砕液中の酵素系が透析, 活性炭処理により活性を失い, Mn^{++} その他 (A.T.P., D.P.N. または T.P.N.) の添加により復活しこの生合成にこれらの Co-factor が要求されること²⁷⁾, トマト磨砕液により MVA から Lycopene が生成されるとき助酵素の一つとして Mn^{++} が要求されること²⁸⁾などが知られている。

以上の事実からミブヨモギにおいても同じような過程を経て Santonin の前駆体と考えられる Seequiterpene が生合成され, その酸化によつて Santonin が生成するものと推測するならば, その多くの中間過程においてあるいは終りの段階での酸化過程において, 反応にあずかる酵素または酵素系に Mn^{++} が何らかの形で関与し得ることは十分に予想されるところであり, 本報の実験結果はこの推察を裏付ける一つの根拠となるものと思われる。

IV 総 括

本報の試料は前報¹⁾ 試料に比べ徒長気味で花蕾は重いが葉や茎は軽く幾分成育の劣つた試料であつたが, Mn 施肥試料の Santonin 含量は各組織とも対照試料より 20~30% 増加した。灰分含有率は前回試料より低かつたが, 灰分中の Mn_2O_3 含有率および乾燥試料に対する Mn 含有率は前回試料に比べて高く特に花蕾においては顕著であつた。 $MnCO_3$ は前実験の半量を使用した Mn 含量は前回と同じように各組織とも Mn 施肥試料が対照試料の 2 倍以上となつて, 与えた Mn^{++} はよく吸収されており施肥量は少くてよいことがわかつた。

また Santonin の組織別含有率について分析結果の信頼性を検討し, 含有率の分散分析を行なつて Mn 施肥が有効であることを統計的に証明した。

2 年度にわたる実験の結果から Santonin の生成に Mn^{++} が影響をおよぼすことは明らかとなつたが, 植物器官中での Santonin の生成が III 4) で述べた Isoprenoid の生合成と同じような過程を経るものと考えても, なお

Santonin 生成機構の解明に対する実験的証拠は乏しく²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾, 今後の研究にまつところが多い。

本研究に御指導を賜つた京都大学田中正三教授, 統計処理につき御教示を頂いた同大学岡本一助教授, ならびに試料の栽培管理に当られた日本新薬株式会社薬用植物研究所に深謝致します。

文 献

- 1) 織田, 薬学研究 **33**, 166 (1961)
- 2) Official Methods of Analysis of A. O. A. C. 8th Ed., **22.10** p. 368 (1935)
- 3) 田中, 小沢, 織田, 日化誌 **75**, 471 (1954)
- 4) 北川, 増山, 新編統計教値表 (1952)
- 5) D. E. Wolf, C. H. Hoffman, P. E. Aldrich, H. R. Skeggs, L. D. Wright and K. Folkers, J. Am. Chem. Soc., **78**, 4499 (1956)
- 6) L. D. Wright, E. L. Cresson, H. R. Skeggs, G. D. E. Mac Rae, C. H. Hoffman, D. E. Wolf and K. Folkers, *ibid.*, **78**, 5273 (1956)
- 7) D. E. Wolf, C. H. Hoffman, P. E. Aldrich, H. R. Skeggs, L. D. Wright and K. Folkers, *ibid.*, **79**, 1486 (1957)
- 8) C. H. Hoffman, A. F. Wagner, A. N. Wilson, E. Walton, C. H. Shunk, D. E. Wolf, F. W. Holly and K. Folkers, *ibid.*, **79**, 2316 (1957)
- 9) 田村, 農化誌 **32**, 707 (1958)
- 10) 田村, 鈴木, *ibid.*, **32**, 778 (1958)
- 11) 田村, *ibid.*, **32**, 783 (1958)
- 12) P. A. Tavormina, M. H. Gibbs and J. W. Huff, J. Am. Chem. Soc., **78**, 4498 (1956)
- 13) P. A. Tavormina and M. H. Gibbs, *ibid.*, **78**, 6210 (1956)
- 14) H. Rudney and J. J. Ferguson, Jr., *ibid.*, **79**, 5580 (1957)
- 15) H. Rudney, J. Biol. Chem., **227**, 363 (1957)
- 16) J. J. Ferguson, Jr. and H. Rudney, *ibid.*, **234**, 1072 (1959)
- 17) H. Rudney and J. J. Ferguson, Jr., *ibid.*, **234**, 1076 (1959)
- 18) F. Lynen, 日生化 **30**, 89 (1958)
- 19) C. O. Chichester, H. Yokoyama, T.O.M. Nakayama, A. Lukton and G. Mackinney, J. Biol. Chem. **234**, 598 (1959)
- 20) J. J. Ferguson, Jr., I. F. Durr and H. Rudney, Fed. Proc., **17**, 219 (1958)
- 21) T. T. Tchen, J. Am. Chem. Soc., **79**, 6344 (1957)

- 22) T. T. Tchen, J. Biol. Chem., **233**, 1100 (1958)
- 23) K. Bloch, S. Chaykin, A. H. Phillips and A de Waard, *ibid.*, **234**, 2595 (1959)
- 24) B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning and F. Lynen, J. Am. Chem. Soc., **81**, 1254 (1959)
- 25) B. K. Bachhawat, W. G. Robinson and M. J. Coon, *ibid.*, **76**, 3098 (1954)
- 26) B. K. Bachhawat, W. G. Robinson and M. J. Coon, J. Biol. Chem., **216**, 727 (1955)
- 27) B. H. Amdur, H. Rilling and K. Bloch, J. Am. Chem. Soc., **79**, 2646 (1957)
- 28) E. A. Shneour and I. Zabin, J. Biol. Chem., **234**, 770 (1959)
- 29) 三橋, 江口, 金子, 吉田, 薬学雑誌 **79**, 1224 (1959)
- 30) 織田, 鈴江, 田中, 日本化学会第18年会講演 (1965)
- 31) 織田, 鈴江, 田中, 京都府立大学学術報告 (自然科学) **4**, No. 2, 13 (1965)